

Docket No. 214382US0X/btm

DEC 28 2001



0547 1.6 L1 RECEIVED 1-31-02 JAN 30 2002

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE TECH CENTER 1600/2900

IN RE APPLICATION OF: Andreas BOMMARIUS, et al.

GAU:

SERIAL NO: 09/973,712

EXAMINER: 1652

FILED: October 11, 2001

FOR: ACETYL AMINO ACID RACEMASE FROM AMYCOLATOPSIS ORIENTALIS FOR RACEMIZING CARBAMOYL AMINO ACIDS

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	100 50 123.0	October 11, 2000
GERMANY	100 50 124.9	October 11, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

James J. Kelly
Registration No. 41,504



RECEIVED

JAN 30 2002

TECH CENTER 1600/2900

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 100 50 123.0
Anmeldetag: 11. Oktober 2000
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Erstanmelder: Degussa-Hüls
Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main/DE
Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren
IPC: C 12 P, C 07 B, C 07 C

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Oktober 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Brand

Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren

Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zur Herstellung von optisch angereicherten Aminosäuren und auf deren Verwendung gerichtet. Insbesondere richtet sich das
5 Verfahren zum einen auf die Racemisierung, zum anderen auf das Entschützen von speziellen N-geschützten Aminosäuren, im System Acylase/Racemase zur vollständigen Umsetzung von speziellen N-geschützten racemischen Aminosäuren zu optisch reinen Aminosäuren.

10 Optisch reine Aminosäuren sind für die chemische Synthese sowie die parenterale Ernährung wichtige Ausgangsstoffe. Zur Herstellung optisch reiner Aminosäuren sind dem Fachmann viele Möglichkeiten bekannt. U.a. bieten sich diesbezüglich enzymatische Verfahren an, da sie zum einen kataly-
15 tisch arbeiten und zum anderen die Aminosäuren mit sehr hohen Enantiomerenanreicherungen herzustellen gestatten.

Es ist prinzipiell bekannt, acetylierte Aminosäuren mittels Aminosäureacylasen in L-Aminosäuren umzuwandeln, doch war man der Ansicht, daß diese sich eigentlich nur für die
20 Spaltung von N-acetylgeschützten Aminosäuren und Aminen/Alkoholen eignen (EP99118844.2; A. S. Bommarius et al., Tetrahedron; Asymmetry, 1997, Vol. 8, 3197-3200).

Um den zurückbleibenden D-Acetylanteil ebenfalls nutzen zu können, sind verschiedene Racemisierungsverfahren entwickelt worden. Aus der DE199 352 68.2 ist eine Acetylaminosäureracemase bekannt, welche es zusammen im System Acylase/Acetylaminosäureracemase gestattet, racemisches Acetyl-
25 methionin vollständig in L-Methionin umzuwandeln.

Aus *Streptomyces atratus* Y-53 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 40, 835-840) und *Amycolatopsis* sp. TS-1-60 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995a, 42, 853-859) sind N-Acetylaminosäureracemasen (AAR)
30

bekannt. Von der TS-1-60 weiß man, daß sie in geringem Ausmaß auch N-Carbamoylaminosäuren racemisieren kann.

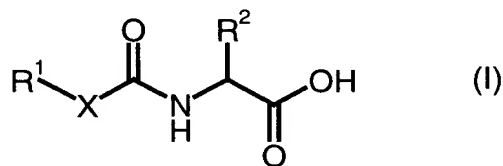
5 Trotzdem besteht ein Bedarf an Verfahren, die es erlauben, auch anders als acetyl- oder carbamoyl-geschützte Aminosäuren zu racemisieren und ggf. durch eine darauf folgende enzymatische Schutzgruppenabspaltung zur Gänze in die optisch angereicherte Aminosäure umzuwandeln.

10 Aufgabe der vorliegenden Anmeldung war deshalb die Angabe eines Verfahrens zur Herstellung von optisch angereicherten Aminosäuren aus einer racemischen Mischung von Aminosäuren, welche mittels einer Urethan- oder Carbamoylschutzgruppe N-geschützt vorliegen.

15 Die Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Anspruch 2 ist auf den ersten Aspekt der vorliegenden Reaktion - die Racemisierung - gerichtet, während Anspruch 3 den zweiten Aspekt der betrachteten Reaktion - die Schutzgruppenabspaltung betrifft. Ansprüche 4 und 5 betreffen besondere Ausführungsformen der gegenständlichen Umsetzung. Anspruch 6 ist auf eine Verwendung der
20 mittels dieses Verfahrens hergestellten Aminosäuren gerichtet.

Dadurch, daß man ein Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten Aminosäuren bereitstellt, wobei Verbindungen der Formel (I)

25



worin

X = O, NH ist,

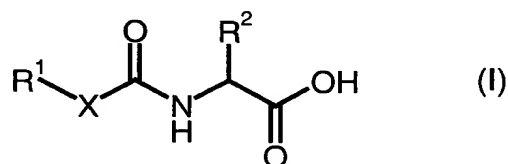
R¹ = CH₃, CH₃CH₂, tert.-Butyl, Benzyl ist, wobei im Falle

30 von X = NH R¹ = H sein kann,

R^2 = der α -Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure ist, mit einem N-Acetylaminosäureracemaseaktivität aufweisenden Enzym (AAR) in Gegenwart oder anschließend mit einem Aminosäureacylaseaktivität aufweisenden Enzym umgesetzt werden, gelangt man völlig überraschend in einer zum Acetylaminosäureweg (DE19935268.2) äquivalenten dafür aber nicht minder vorteilhaften Art und Weise zu optisch hoch angereicherten Aminosäuren der genannten Art. Es war bisher nicht bekannt, daß Aminosäureacylasen in Verbindung mit Acetylaminosäureracemasen auf oben genannte Verbindungsklasse angewendet werden können.

In einem nächsten Aspekt beschäftigt sich die Erfindung mit einem Verfahren zur Racemisierung von N-geschützten Aminosäuren der allgemeinen Formel (I)

15



worin

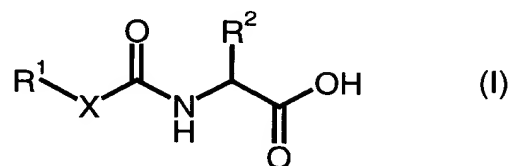
X = O, NH ist,

R^1 = CH₃, CH₃CH₂, tert.-Butyl, Benzyl ist,

R^2 = der α -Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure ist,

unter Verwendung eines N-Acetylaminosäureracemaseaktivität aufweisenden Enzyms.

In wiederum einem weiteren Aspekt ist die Erfindung auf ein Verfahren zur Abspaltung der Schutzgruppe von N-geschützten Aminosäuren der allgemeinen Formel (I)



5

worin

X = O, NH ist,

R¹ = CH₃, CH₃CH₂, tert.-Butyl, Benzyl ist, wobei im Falle von X = NH R¹ = H sein kann,

10 R² = der α-Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure ist,

unter Verwendung einer Aminosäureacylaseaktivität aufweisenden Enzyms gerichtet.

15

Wie oben schon angedeutet war bisher von beiden Verfahrens-
aspekten nicht bekannt, daß die entsprechenden eingesetzten
Enzyme die genannten Verbindungen erfindungsgemäß umsetzen
können. Das Auffinden dieser neuen Aktivität ist mit ur-
sächlich dafür, daß die beschriebenen Enzyme erfolgreich in
einem chemischen Prozeß zur Herstellung von Aminosäuren wie
eingangs erwähnt eingesetzt werden können.

20

Unter N-Acetylaminosäureracemase wird eine Klasse von Enzy-
men bezeichnet, die optisch angereicherte N-
Acetylaminosäuren racemisieren kann.

25

Aufgrund der großen Homologie auf Proteinebene, die diese
Enzyme untereinander aufweisen, können im Prinzip alle dem
Fachmann bekannten N-Acetylaminosäureracemasen für die vor-
liegenden Umsetzungen herangezogen werden. Bevorzugt einzu-
setzende Racemasen sind die aus *Streptomyces atratus* Y-53
sowie *Amycolatopsis* sp. TS-1-60. Es ist jedoch besonders ein
30 Verfahren bevorzugt, bei dem man die N-
Acetylaminosäureracemase aus *Amycolatopsis orientalis*

subspecies *lurida* (Seq. 2) benutzt, da diese gegenüber den anderen Vertretern dieser Verbindungsklasse Vorteile im Hinblick auf die Metallionenabhängigkeit und Aktivität besitzt (EP99118844.2).

- 5 Als Aminosäureacylasen werden im Rahmen der Erfindung Enzyme verstanden, welche N-Acylaminosäuren stereospezifisch deacetylieren. Im Prinzip können alle dem Fachmann bekannten Vertreter dieser Verbindungsklasse, die sich für die erfindungsgemäßen Reaktionen eignen, herangezogen werden.
- 10 Bevorzugt sind allerdings Aminosäureacylasen wie die L-spezifische Acylase I aus *Aspergillus oryzae* oder eine D-spezifische Acylase. Beide Aminosäureacylasen sind bei der Firma Amano erhältlich. Weitere für die Reaktion einsetzbare Acylasen sind in folgenden Literaturstellen beschrieben:
- 15 Wakayama M, Yada H, Kanda S, Hayashi S, Yatsuda Y, Sakai K, Moriguchi M, Role of conserved histidine residues in D-aminoacylase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000 Jan;64(1):1-8; Wakayama M, Hayashi S, Yatsuda Y, Katsuno Y, Sakai K, Moriguchi M., Overproduction of D-aminoacylase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6 in *Escherichia coli* and its purification, *Protein Expr. Purif.* 1996
- 20 Jun;7(4):395-9; Wakayama M, Katsuno Y, Hayashi S, Miyamoto Y, Sakai K, Moriguchi M., Cloning and sequencing of a gene encoding D-aminoacylase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6 and expression of the gene in *Escherichia coli*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995
- 25 Nov;59(11):2115-9; Wakayama M, Ashika T, Miyamoto Y, Yoshikawa T, Sonoda Y, Sakai K, Moriguchi M.; Primary structure of N-acyl-D-glutamate amidohydrolase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6, *J. Biochem. (Tokyo)*. 1995
- 30 Jul;118(1):204-9; Chen HP, Wu SH, Wang KT., D-Aminoacylase from *Alcaligenes faecalis* possesses novel activities on D-methionine, *Bioorg. Med. Chem.* 1994 Jan;2(1):1-5; Moriguchi
- 35 M, Sakai K, Miyamoto Y, Wakayama M., Production, purification, and characterization of D-aminoacylase from *Alcalige-*

- nes xylosoxydans subsp. xylosoxydans A-6, Biosci. Biotechnol. Biochem. 1993 Jul;57(7):1149-52; Yang YB, Hsiao KM, Li H, Yano H, Tsugita A, Tsai YC, Characterization of D-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* DA181, Biosci. Biotechnol. Biochem. 1992 Sep;56(9):1392-5; Tsai YC, Lin CS, Tseng TH, Lee H, Wang YJ, Production and immobilization of D-aminoacylase of *Alcaligenes faecalis* DA1 for optical resolution of N-acyl-DL-amino acids, Enzyme Microb. Technol. 1992 May;14(5):384-9; Batisse N, Weigel P, Lecocq M, Sakanyan V., Two amino acid amidohydrolase genes encoding L-stereospecific carbamoylase and aminoacylase are organized in a common operon in *Bacillus stearothermophilus*, Appl. Environ. Microbiol. 1997 Feb;63(2):763-6; Yang YB, Hu HL, Chang MC, Li H, Tsai YC, Purification and characterization of L-aminoacylase from *Alcaligenes denitrificans* DA181, Biosci. Biotechnol. Biochem. 1994 Jan;58(1):204-5; Jakob M, Miller YE, Rohm KH, Cloning and sequence analyses of cDNAs encoding aminoacylase I from porcine kidney, Biol. Chem. Hoppe Seyler. 1992 Dec;373(12):1227-31; Mitta M, Ohnogi H, Yamamoto A, Kato I, Sakiyama F, Tsunasawa S., The primary structure of porcine aminoacylase 1 deduced from cDNA sequence, J. Biochem. (Tokyo). 1992 Dec;112(6):737-42; Bommarius AS, Drauz K, Klenk H, Wandrey C., Operational stability of enzymes. Acylase-catalyzed resolution of N-acetyl amino acids to enantiomerically pure L-amino acids, Ann. N Y Acad. Sci. 1992 Nov 30;672:126-36; Gentzen I, Löffler HG, Schneider F., Aminoacylase from *Aspergillus oryzae*. Comparison with the pig kidney enzyme, Z. Naturforsch. [C]. 1980 Jul-Aug;35(7-8):544-50;
- 30 Die erfindungsgemäße Reaktion wird vorzugsweise in einem Enzym-Membran-Reaktor durchgeführt (DE 199 10 691.6).

In einem weiteren Aspekt beschäftigt sich die Erfindung mit der Verwendung der nach Anspruch 1 oder 3 hergestellten Aminosäuren. Im Prinzip können diese in allen dem Fachmann bekannten Nutzungsmöglichkeiten für enantiomer angereicher-

te Aminosäuren wie parenterale Ernährung oder Tierernährung eingesetzt werden. Vorzugsweise jedoch dienen die optisch angereicherten Aminosäuren zur Synthese bioaktiver Verbindungen.

- 5 Die genannten Enzyme können in freier Form als homogen aufgereinigte Verbindungen oder als rekombinant hergestellte Enzyme zusammen oder nacheinander verwendet werden. Weiterhin können die Enzyme auch als Bestandteil eines Gastorga-
- 10 nismus (Ganzzellkatalysator wie in US09/407062) eingesetzt werden oder in Verbindung mit der aufgeschlossenen Zellmasse des Wirtsorganismus. Möglich ist ebenfalls die Verwendung der Enzyme in immobilisierter Form (Bhavender P. Sharma, Lorraine F. Bailey and Ralph A. Messing, "Immobilisierte Biomaterialien - Techniken und Anwendungen", Angew.
- 15 Chem. 1982, 94, 836-852). Vorteilhafterweise erfolgt die Immobilisierung durch Lyophilisation (Dordick et al. J. Am. Chem. Soc. 194, 116, 5009-5010; Okahata et al. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 1971-1974; Adlercreutz et al. Biocatalysis 1992, 6, 291-305). Ganz besonders bevorzugt ist die Lyophi-
- 20 lisation in Gegenwart von oberflächenaktiven Substanzen, wie Aerosol OT oder Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglycol (PEG) oder Brij 52 (Diethylenglycol-mono-cetyläther) (Goto et al. Biotechnol. Techniques 1997, 11, 375-378).
- 25 Unter optisch angereicherten (enantiomerenangereicherten) Verbindungen wird im Rahmen der Erfindung das Vorliegen einer optischen Antipode im Gemisch mit der anderen in >50 mol-% verstanden.

- Unter α -Rest einer Aminosäure wird der am α -C-Atom einer
- 30 α -Aminosäure befindliche Rest verstanden. Dieser kann sich von einer natürlichen Aminosäure, wie in Beyer-Walter, Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 22. Auflage, 1991, S.822f. dargestellt, ableiten. Darüberhinaus sind jedoch auch entsprechende α -Reste unna-

türlicher α -Aminosäuren gemeint wie z.B. in DE19903268.8
aufgeführt.

Der Mikroorganismus *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida*
ist unter der Nummer DSM43134 bei der Deutschen Sammlung
5 für Mikroorganismen hinterlegt.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Huels AG

5 <120> Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren

<130> 000399 AM

<140>

10 <141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1107

<212> DNA

20 <213> Amycolatopsis orientalis

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1107)

25 <400> 1

gtg	aaa	ctc	agc	ggt	gtg	gaa	ctg	cgc	cgg	gtc	cgg	atg	ccg	ctc	gtg	48
Val	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Arg	Val	Arg	Met	Pro	Leu	Val	
1				5					10					15		

gcc	ccg	ttc	cgg	acg	tcg	ttc	ggg	acg	cag	tcc	gag	cgg	gaa	ttg	ctg	96
Ala	Pro	Phe	Arg	Thr	Ser	Phe	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	
			20					25					30			

ctg	gtc	cgc	gcg	gtg	acc	ccg	gcg	ggc	gag	ggc	tgg	ggc	gaa	tgt	gtc	144
Leu	Val	Arg	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	Glu	Cys	Val	
		35					40					45				

gcg	atg	gag	gcg	ccg	ctc	tac	tcg	tcg	gag	tac	aac	gac	gcc	gcc	gag	192
Ala	Met	Glu	Ala	Pro	Leu	Tyr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Asn	Asp	Ala	Ala	Glu	
	50					55					60					

cac	gtg	ctg	cgg	aac	cat	ctg	atc	ccc	gca	ctg	ctg	gcg	gcc	gag	gac	240
His	Val	Leu	Arg	Asn	His	Leu	Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Glu	Asp	
65					70					75				80		

gtg	acc	gcg	cac	aag	gtg	acg	ccg	ttg	ctg	gcg	aag	ttc	aag	ggc	cac	288
Val	Thr	Ala	His	Lys	Val	Thr	Pro	Leu	Leu	Ala	Lys	Phe	Lys	Gly	His	
				85				90						95		

cgg	atg	gcg	aag	ggc	gcg	ctg	gag	atg	gcg	gtc	ctc	gac	gcc	gaa	ctc	336
Arg	Met	Ala	Lys	Gly	Ala	Leu	Glu	Met	Ala	Val	Leu	Asp	Ala	Glu	Leu	
			100					105					110			

cgc	gcg	cat	gac	cgg	tcc	ttc	gcg	gcc	gag	ctg	ggg	tcc	act	cgc	gac	384
Arg	Ala	His	Asp	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Glu	Leu	Gly	Ser	Thr	Arg	Asp	
		115					120					125				

tcc	gtg	gcc	tgc	ggg	gtc	tcg	gtc	ggg	atc	atg	gac	tcg	atc	ccg	cac	432
Ser	Val	Ala	Cys	Gly	Val	Ser	Val	Gly	Ile	Met	Asp	Ser	Ile	Pro	His	

	130	135	140	
5	ctg ctc gac gtc gtc ggc ggc tac ctc gac gag ggc tac gtc cgg atc Leu Leu Asp Val Val Gly Gly Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Val Arg Ile 145 150 155 160	480		
10	aag ctg aag atc gag ccc ggc tgg gac gtc gag ccg gtc cgg cag gtg Lys Leu Lys Ile Glu Pro Gly Trp Asp Val Glu Pro Val Arg Gln Val 165 170 175	528		
15	cgt gag cgc ttc ggt gac gac gtg ctg ctg cag gtc gac gcg aac acc Arg Glu Arg Phe Gly Asp Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Ala Asn Thr 180 185 190	576		
20	gcg tac acg ctg ggc gac gcg ccc ctg ctg tcc cgg ctc gac ccg ttc Ala Tyr Thr Leu Gly Asp Ala Pro Leu Leu Ser Arg Leu Asp Pro Phe 195 200 205	624		
25	gac ctg ctg ctg atc gag cag ccg ctc gaa gaa gag gac gtg ctc ggc Asp Leu Leu Leu Ile Glu Gln Pro Leu Glu Glu Glu Asp Val Leu Gly 210 215 220	672		
30	cac gcc gag ctg gcc aag cgg atc cgg acg ccg atc tgc ctc gac gag His Ala Glu Leu Ala Lys Arg Ile Arg Thr Pro Ile Cys Leu Asp Glu 225 230 235 240	720		
35	tcg atc gtc tcg gcc aag gcc gcc gcg gac gcg atc aag ctc ggc gcc Ser Ile Val Ser Ala Lys Ala Ala Asp Ala Ile Lys Leu Gly Ala 245 250 255	768		
40	tgc cag atc gtc aac atc aaa ccg ggc cgg gtc ggc gga tac ctc gaa Cys Gln Ile Val Asn Ile Lys Pro Gly Arg Val Gly Gly Tyr Leu Glu 260 265 270	816		
45	gcc cgc cgg gtg cac gac gtc tgc gcg gca cac ggg atc gcg gtg tgg Ala Arg Arg Val His Asp Val Cys Ala Ala His Gly Ile Ala Val Trp 275 280 285	864		
50	tgc ggc ggg atg atc gag acc ggg ctc ggc cgg gcg gcc aac gtc gca Cys Gly Gly Met Ile Glu Thr Gly Leu Gly Arg Ala Ala Asn Val Ala 290 295 300	912		
55	ctg gcc tcg ctg ccc ggc ttc acg ctg ccg ggg gac acc tcg gcg tcc Leu Ala Ser Leu Pro Gly Phe Thr Leu Pro Gly Asp Thr Ser Ala Ser 305 310 315 320	960		
60	ggc cgg ttc tat cgc acc gac atc acc gag ccg ttc gtg ctg gac gcc Gly Arg Phe Tyr Arg Thr Asp Ile Thr Glu Pro Phe Val Leu Asp Ala 325 330 335	1008		
65	ggg cat ctg ccg gtg ccg acc ggg ccg ggc ctc ggg gtg act ccg att Gly His Leu Pro Val Pro Thr Gly Pro Gly Leu Gly Val Thr Pro Ile 340 345 350	1056		
70	ccg gat ctt ctg gac gag gtc acc acg gag aaa gcg tgg atc ggt tcg Pro Asp Leu Leu Asp Glu Val Thr Thr Glu Lys Ala Trp Ile Gly Ser 355 360 365	1104		
	tag	1107		

<210> 2
 <211> 368
 5 <212> PRT
 <213> Amycolatopsis orientalis

 <400> 2
 10 Val Lys Leu Ser Gly Val Glu Leu Arg Arg Val Arg Met Pro Leu Val
 1 5 10 15
 Ala Pro Phe Arg Thr Ser Phe Gly Thr Gln Ser Glu Arg Glu Leu Leu
 20 25 30
 Leu Val Arg Ala Val Thr Pro Ala Gly Glu Gly Trp Gly Glu Cys Val
 35 40 45
 15 Ala Met Glu Ala Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Ala Ala Glu
 50 55 60
 His Val Leu Arg Asn His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 20 Val Thr Ala His Lys Val Thr Pro Leu Leu Ala Lys Phe Lys Gly His
 85 90 95
 Arg Met Ala Lys Gly Ala Leu Glu Met Ala Val Leu Asp Ala Glu Leu
 100 105 110
 Arg Ala His Asp Arg Ser Phe Ala Ala Glu Leu Gly Ser Thr Arg Asp
 115 120 125
 25 Ser Val Ala Cys Gly Val Ser Val Gly Ile Met Asp Ser Ile Pro His
 130 135 140
 Leu Leu Asp Val Val Gly Gly Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Val Arg Ile
 145 150 155 160
 30 Lys Leu Lys Ile Glu Pro Gly Trp Asp Val Glu Pro Val Arg Gln Val
 165 170 175
 Arg Glu Arg Phe Gly Asp Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Ala Asn Thr
 180 185 190
 Ala Tyr Thr Leu Gly Asp Ala Pro Leu Leu Ser Arg Leu Asp Pro Phe
 195 200 205
 35 Asp Leu Leu Leu Ile Glu Gln Pro Leu Glu Glu Glu Asp Val Leu Gly
 210 215 220
 His Ala Glu Leu Ala Lys Arg Ile Arg Thr Pro Ile Cys Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 40 Ser Ile Val Ser Ala Lys Ala Ala Ala Asp Ala Ile Lys Leu Gly Ala
 245 250 255
 Cys Gln Ile Val Asn Ile Lys Pro Gly Arg Val Gly Gly Tyr Leu Glu
 260 265 270
 Ala Arg Arg Val His Asp Val Cys Ala Ala His Gly Ile Ala Val Trp
 275 280 285
 45 Cys Gly Gly Met Ile Glu Thr Gly Leu Gly Arg Ala Ala Asn Val Ala
 290 295 300
 Leu Ala Ser Leu Pro Gly Phe Thr Leu Pro Gly Asp Thr Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 50 Gly Arg Phe Tyr Arg Thr Asp Ile Thr Glu Pro Phe Val Leu Asp Ala
 325 330 335
 Gly His Leu Pro Val Pro Thr Gly Pro Gly Leu Gly Val Thr Pro Ile
 340 345 350
 Pro Asp Leu Leu Asp Glu Val Thr Thr Glu Lys Ala Trp Ile Gly Ser
 355 360 365
 55

Beispiele:

1. Nachweis der Racemaseaktivität des rekombinanten AAR-Enzyms

Das Substratspektrum der N-Acetylaminosäureracemase aus *A-mycolatopsis orientalis subsp. lurida* wurde mit dem unten
5 beschriebenen Enzymassay getestet.

Der Assay setzte sich wie folgt zusammen:

	Puffer Tris/HCl	50 mM (pH 8,0)
10	Substrat	25 mM
	Cobaltchlorid	6 mM
	AAR	ca. 150 µg gereinigtes Protein
	Endvolumen	1 ml

Im Assay wurden enantiomerenreine Aminosäure-Derivate ein-
15 gesetzt und die Bildung des entsprechenden Racemats im Polarimeter (Perkin-Elmer 241) verfolgt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C (heizbare Küvette) für 3 bis 12 Stunden. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365$ nm.

20 Tabelle 1: Auflistung der getesteten Substrate und der entsprechenden spezifischen Aktivität der AAR.

Substrat	Spezifische Aktivität
N-Methyloxycarbonyl-L-Met	42 mU/mg

2. D-Met, bzw. L-Met aus Moc-L-Met

A. L-Met aus Moc-L-Met:

Puffer Tris/HCl 50 mM (pH 8,0)

Moc-L-Met 25 mM

5 Cobaltchlorid 6 mM

L-Acylase 2,0 U

(Aspergillus oryzae)

Endvolumen 200 µL

Volumenaktivität: 1,4 U/ml

10

B. D-Met aus Moc-L-Met:

Puffer Tris/HCl 50 mM (pH 8,0)

Moc-L-Met 25 mM

Cobaltchlorid 6 mM

15 D-Acylase 2,4 U

(AMANO)

AAR 0,4 U

Endvolumen 200 µL

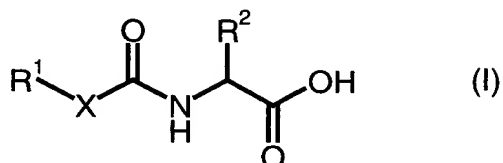
Volumenaktivität: 0,6 U/ml

20

D-Met, bzw. L-Met wurden über HPLC (RP18) nachgewiesen, die Unit-Angaben der Enzyme beziehen sich auf spezifische Aktivität mit N-Ac-L-Met, bzw. N-Ac-D-Met als Substrat.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten Aminosäuren, wobei Verbindungen der Formel (I)



5

worin

X = O, NH ist,

R¹ = CH₃, CH₃CH₂, tert.-Butyl, Benzyl ist, wobei im Falle von X = NH R¹ = H sein kann,

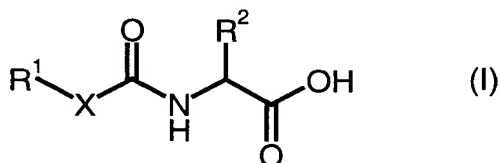
10

R² = der α-Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure ist,

mit einem N-Acetylaminosäureracemaseaktivität aufweisenden Enzym (AAR) in Gegenwart oder anschließend mit einem Aminosäureacylaseaktivität aufweisenden Enzym umgesetzt werden.

15

2. Verfahren zur Racemisierung von N-geschützten Aminosäuren der allgemeinen Formel (I)



20

worin

X = O, NH ist,

R¹ = CH₃, CH₃CH₂, tert.-Butyl, Benzyl ist,

R² = der α-Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure ist,

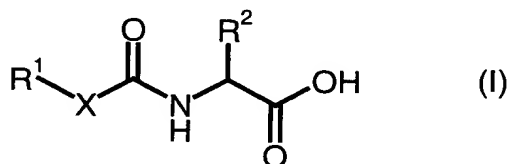
25

unter Verwendung eines

N-Acetylaminosäureracemaseaktivität aufweisenden En-

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren gerichtet. Insbesondere betrifft das Verfahren die Herstellung von enantiomerenangereicherten Aminosäuren, wobei Verbindungen der Formel (I)



worin

X = O, NH ist,

10 R¹ = CH₃, CH₃CH₂, tert.-Butyl, Benzyl ist, wobei im Falle von X = NH R¹ = H sein kann,

R² = der α-Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure ist,

mit einem N-Acetylaminosäureracemaseaktivität aufweisenden
15 Enzym (AAR) in Gegenwart oder anschließend mit einem Aminosäureacylaseaktivität aufweisenden Enzym umgesetzt werden.

Verwendung der mittels dieser Reaktion gewonnenen Aminosäuren.